

Trabajo Fin de Grado

“Estudio de la actividad antitumoral de complejos metálicos por hipertermia”

Autor:

Ignacio Balbás Vaquero

Directoras:

Elena Cerrada Lamuela
M^a Jesús Rodríguez Yoldi



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Febrero 2019

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen/Abstract | 1 |
| 1. Introducción | 2 |
| 1.1. Complejos metálicos en el tratamiento del cáncer | 2 |
| 1.2. Complejos de oro | 3 |
| 1.3. Dianas moleculares | 4 |
| 1.3.1. Tiorredoxina reductasa | 4 |
| 1.3.2. Proteasoma | 4 |
| 1.4. Hipertermia | 5 |
| 1.5. Nuevos compuestos con flúor | 5 |
| 2. Objetivos | 7 |
| 3. Materiales y métodos | 8 |
| 3.1. Síntesis química de los complejos de oro | 8 |
| 3.2. Cultivo celular | 9 |
| 3.3. Ensayo de viabilidad celular (MTT) | 10 |
| 3.4. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) | 10 |
| 4. Resultados y discusión | 11 |
| 4.1. Capacidad antitumoral de los complejos de oro | 11 |
| 4.2. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) | 12 |
| 4.3. Efectos de la hipertermia | 14 |
| 5. Conclusiones/conclusions | 15 |
| Referencias | 17 |

RESUMEN

Desde el descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino en los años sesenta, se han desarrollado gran cantidad de complejos metálicos en busca del fármaco antitumoral óptimo: aquel que presente una alta especificidad hacia las células tumorales, evitando a su vez tanto la aparición de efectos secundarios como el desarrollo de resistencias adquiridas.

Las investigaciones en torno a los complejos metálicos se extienden hasta el día de hoy, habiéndose desarrollado un gran abanico de estructuras, con el empleo de diferentes metales y una gran diversidad de tipos de ligandos. El presente trabajo, se ha centrado en el estudio particular de dos familias de complejos metálicos de oro.

Hemos llevado a cabo el estudio de las propiedades biológicas de dichos complejos y de los ligandos libres sobre una línea celular de cáncer de colon humano (Caco-2/TC7). Se han realizado diversos ensayos para evaluar tanto su actividad anticancerígena como su selectividad. Además, en el trabajo se han analizado los efectos de un leve aumento de temperatura sobre el tratamiento (hipertermia), así como los efectos del flúor sobre la actividad antitumoral.

De los seis complejos estudiados, cinco de ellos han demostrado tener una alta capacidad para producir la muerte de las células cancerosas, siendo además totalmente inocuos para las células normales (enterocitos). Los resultados de la hipertermia han sido diferentes de lo esperado, probablemente porque las condiciones de ensayo no han sido las más adecuadas. Sin embargo, hemos confirmado que la presencia del flúor es un factor decisivo, aumentando considerablemente la actividad anticancerígena de los complejos.

ABSTRACT

Since the discovery in 1960s of the antitumor activity of cisplatin, many metal complexes have been developed searching for the optimum anticancer drug: one with high specificity towards tumor cells, avoiding the appearance of side effects and the development of acquired resistances.

This search continues today. A wide range of structures has appeared, employing different metals and high variety of ligands. The aim of this work is the study of two families of gold complexes.

Biological properties of these complexes have been tested on a human colon cancer cell line (Caco-2/TC7). Some tests have been realized to evaluate both its anticancer activity and its selectivity. In addition, two more variables have been analysed in this work: the effects of a mild temperature increase (hyperthermia) and the effects of fluorine on antitumor activity.

As a result, five out of the six complexes have shown high activity against cancer cells and any kind of damage to the non-tumor enterocytic cells. The results of hyperthermia have been unexpected, since essay conditions seem not to be the adequate ones. However, it has been confirmed the presence of fluorine as a key factor, significantly increasing the anticancer activity of the complexes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Complejos metálicos en el tratamiento del cáncer

El origen de los complejos metálicos como agentes anticancerígenos se remonta a la década de los 60, con el descubrimiento de Rosenberg mediante serendipia de la inhibición de la división celular por complejos de platino¹. Al evaluar los efectos de un campo eléctrico sobre un cultivo bacteriano suspendido entre dos electrodos de platino, observó que tras una hora, las células habían dejado de dividirse, siendo este efecto debido a la acción de varios complejos de platino derivados de los electrodos².

Más tarde se fue estudiando el mecanismo de acción de estos compuestos, en concreto del *cisplatino* (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], *figura 1*), ya que ha sido el más utilizado y por tanto el más estudiado. El cisplatino, una vez entra en la célula, intercambia sus cloruros por agua, generando una especie cargada positivamente. Esta molécula se une covalentemente al imidazol de las bases púricas, con especial afinidad por la guanina, dando lugar a una estructura retorcida en el DNA con efectos citotóxicos sobre la célula, causando su muerte³.

En 1971 el cisplatino entró en fase I de ensayo clínico², y en 1978 se aprobó su uso médico para cáncer de testículo y de ovario⁴. A pesar del éxito inicial en estos tipos de cáncer, y de la extensión en los años posteriores a muchos otros tipos (carcinomas orofaríngeo, broncogénico y cervical, osteosarcoma, melanoma, linfoma...)⁵, se han seguido desarrollando gran cantidad de complejos derivados, de los cuales sólo unos pocos están aprobados para su uso comercial. Esta búsqueda de nuevos complejos se debe principalmente a que el empleo de cisplatino como agente anticancerígeno origina considerables efectos secundarios en los pacientes, entre los que se incluyen náuseas, vómitos, daño en los oídos, pérdida de sensaciones del cuerpo, insuficiencia renal...⁶.

Por otro lado el empleo continuado de cisplatino origina una resistencia adquirida por parte de algunos tumores⁶. Debido a estos motivos, se ha conseguido desarrollar una segunda generación de compuestos de platino, entre la que destaca el carboplatino (*figura 1*) con menores efectos tóxicos para una misma concentración, y una tercera generación, en la que destaca el oxaliplatino (*figura 1*), con actividad frente al tumor colorrectal y frente a diferentes tumores resistentes al cisplatino⁷. Este último compuesto es el más utilizado hoy en día. Se emplea como tratamiento estándar en el cáncer de colon en combinación con otros compuestos como 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecan y bevacizumab⁸, que actúan como agentes adyuvantes.

Las nuevas generaciones de complejos de platino apuestan por compuestos polinucleares como el BBR3464 (*figura 1*), que es eficaz incluso contra células tumorales que han desarrollado resistencia frente al cisplatino. De la misma forma que éste, forma enlaces con el DNA, y debido a su mayor número de cargas positivas lo hace de forma más rápida. Además, se han ido explorando otras posibilidades como en el caso del picoplatino (*figura 1*), que unido a una metilpiridina impide estéricamente la degradación del complejo por parte del glutatión².

Las investigaciones en torno a los complejos de platino se han ido ampliando a otros metales. El rutenio ha sido también muy estudiado debido a que posee una mayor estabilidad, lo que genera un menor rango de liberación de ligandos, permitiendo un control mayor en el proceso de liberación del fármaco².

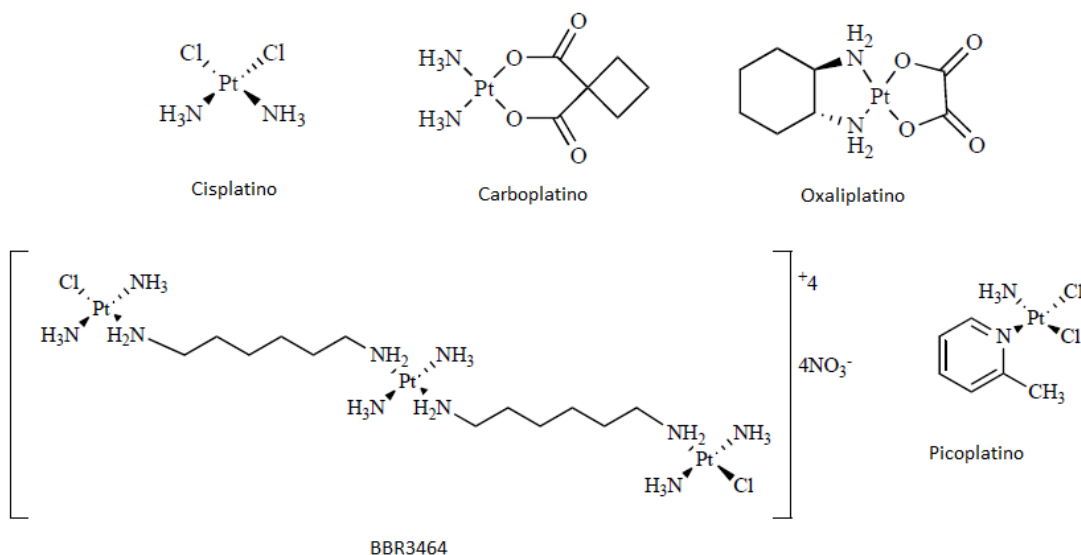


Figura 1. Evolución de los complejos metálicos de platino. La línea temporal se representa de izquierda a derecha.

Debido a su alto parecido con el platino, se han estudiado también los complejos de paladio como fármacos antitumorales. El paladio posee mejor solubilidad en el medio intracelular, así como una velocidad mucho mayor en la reacción de acuación. Además, la toxicidad que generan en el organismo es menor⁹.

Es fácil entender que si el abanico de complejos metálicos es tan grande, se debe a que ninguno de ellos reúne a la perfección todas las características deseables como agente antitumoral (que sean específicos y reduzcan tanto los efectos secundarios como el desarrollo de resistencias adquiridas).

1.2. Complejos de oro

La búsqueda del fármaco antitumoral más favorable continúa, y se comienza a estudiar el oro como posible candidato. El uso médico del oro no es reciente, previamente fue utilizado en la medicina tradicional china para tratar palpitaciones, convulsiones o infecciones cutáneas. En la medicina moderna ha sido ampliamente utilizado en la odontología, con las prótesis dentales. Además, los iones de oro tienen también efectos farmacológicos. Se han utilizado desde hace 90 años para reducir el dolor de la artritis reumatoide, ya que actúan sobre diversos puntos del sistema inmunitario (activación de los linfocitos T, la presentación antigénica, sobreproducción de citoquinas proinflamatorias, expresión de la ciclooxigenasa...) produciendo un efecto antiinflamatorio¹⁰.

En este grupo de fármacos antiartríticos, destaca el *auranofin* (figura 2), debido a que es posible su administración oral, a diferencia del resto. Este compuesto ha sido ampliamente estudiado, y se consideró la posibilidad de utilizar los complejos de oro como anticancerígenos cuando se demostró tanto *in vitro* como *in vivo* su efecto inhibitorio del crecimiento celular¹¹.

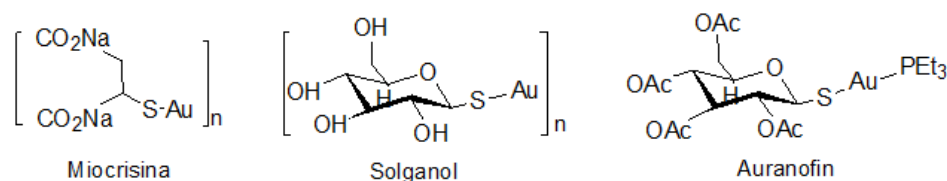


Figura 2. Ejemplos de fármacos empleados contra la artritis reumatoide.

1.3. Dianas moleculares

Mientras que la diana molecular del platino y sus derivados es el DNA, en el caso de los complejos de oro los efectos sobre el DNA son débiles, pero son capaces de unirse a varias proteínas. Se ha propuesto que estos derivados atacan a residuos de cisteínas expuestos, rompiendo puentes disulfuro y oxidando metioninas y glicinas. Entre las principales dianas moleculares se encuentran la tiorredoxina reductasa (TrxR) y el proteasoma¹².

1.3.1. Tiorredoxina reductasa

La tiorredoxina reductasa es una proteína que cataliza la reducción dependiente de NADPH de la tiorredoxina y otros compuestos celulares oxidados. Por tanto, tiene una amplia especificidad de sustrato y está involucrada en diferentes rutas metabólicas para mantener la homeostasis del organismo. En resumen, está implicada en mantener el equilibrio de la célula para evitar el estrés oxidativo¹³.

Debido al desequilibrio redox de las células tumorales, la tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa están sobreexpresadas en muchos tipos de cáncer. Se piensa que el mecanismo principal de acción de los compuestos de oro es la modificación redox irreversible de una selenocisteína del centro activo, debido principalmente a la gran afinidad del centro metálico hacia los átomos de selenio. De esta forma, se inhibe la enzima provocando un desequilibrio en las especies reactivas de oxígeno letal para la célula¹⁴.

1.3.2. Proteasoma

El sistema ubiquitina-proteasoma es esencial para gran cantidad de procesos celulares, incluyendo el ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación... Es por tanto una molécula con un papel importante en algunos estados patológicos, como es el de nuestro caso: el cáncer, donde algunas proteínas aumentan su vida media debido a una menor degradación por parte del proteasoma, y otras disminuyen su vida media debido a una mayor velocidad de degradación¹⁵. El proteasoma contiene diversas actividades peptidasa (quimotripsina, tripsina...). Se puede actuar sobre ellas mediante fármacos para provocar el efecto de interés. De hecho, se han testado diversos compuestos de cobre y de oro con ligandos del tipo ditiocarbamato como potentes inhibidores del proteasoma¹⁶.

La consecuencia de esta inhibición es la acumulación de proteínas ubiquitinadas (señal de degradación para el proteasoma) en la célula, lo que termina induciendo la apoptosis. Dado que las células tumorales requieren una elevada síntesis proteica, aumenta su dependencia del correcto funcionamiento del proteasoma, por tanto son células más sensibles a la inhibición de este sistema. Si se utilizan las concentraciones adecuadas del complejo de oro, se produce la apoptosis selectiva de las células tumorales, con una toxicidad tolerable para el organismo¹⁶.

1.4. Hipertermia

La hipertermia consiste en la exposición temporal de una zona, órgano, tejido o grupo de células a una temperatura más elevada que la fisiológica (41-44°C). Este aumento de temperatura afecta a los ácidos nucleicos, membranas celulares, citoesqueleto y enzimas, bloqueando de esta forma la síntesis de DNA y RNA¹⁷.

La energía térmica utilizada en el proceso (en función de los grados de aumento y del tiempo de exposición) está directamente relacionada con la cantidad de energía necesaria para la desnaturalización proteica¹⁸. Al perderse la estructura de las proteínas, se ven afectadas las propiedades físicas de la membrana plasmática, como la fluidez y la permeabilidad. Es por esto que esta técnica se ha utilizado en combinación con diversos fármacos, ya que se favorece su interiorización en la célula.

Además, la hipertermia tiene un factor positivo más, aparte de los anteriormente mencionados, en el caso del cáncer. No existe apenas diferencia entre la sensibilidad que presentan células normales y células tumorales frente al aumento de temperatura *in vitro*. Sin embargo, la estructura desordenada de los tumores sólidos *in vivo* genera zonas con hipoxia y menor pH¹⁸. Estos factores hacen a las células malignas más sensibles al tratamiento, ya que tienen una mayor dificultad para disipar el calor, y por tanto, la combinación de un fármaco con hipertermia genera una mayor selectividad de dicho fármaco hacia las células tumorales,¹⁹ donde se terminan produciendo aumento de su asimilación, modificación de su distribución intracelular y alteraciones de su metabolismo¹⁷. En consecuencia, un mayor y más amplio efecto del fármaco sobre sus dianas moleculares.

1.5. Nuevos compuestos con flúor

Los compuestos fluorados juegan un papel importante dentro del campo de la medicina frente al cáncer. Esto es debido a los efectos que producen los átomos de flúor en los fármacos: se alteran la reactividad y las propiedades físicas, aumenta la estabilidad térmica y oxidativa (ya que el enlace C-F es más fuerte que el C-H) y la característica más importante en nuestro caso, varía la solubilidad de las moléculas en función del número de átomos de flúor²⁰.

La solubilidad es el resultado del equilibrio hidrofobia/hidrofilia del sistema, de forma que al actuar sobre él podemos aumentar la solubilidad, potenciando las tasas de absorción y transporte del fármaco *in vivo*²¹. Debido a este efecto, se han desarrollado numerosos compuestos anticancerígenos fluorados, como el 5-fluorouracilo, faxlodex, prozac o la flutamida, entre otros²⁰.

Además de la mejora del compuesto por la presencia de los átomos de flúor, la idea que se ha querido desarrollar en este trabajo es utilizar la hipertermia para activar selectivamente los fármacos, ya que los compuestos fluorados tienen muy buenas propiedades termomórficas, es decir, dependientes de la temperatura. Se han realizado experimentos previamente donde una serie de complejos perfluorados de rutenio han mostrado una baja solubilidad a 37°C que sin embargo se ve incrementada a 42°C¹⁹. La consecuencia de este efecto se ensayó frente a células tumorales *in vitro*, obteniéndose una alta reducción de la viabilidad celular al subir a 42°C la temperatura del cultivo durante tan sólo 2 de las 72 horas de tratamiento. De esta forma se ha demostrado la respuesta térmica de los compuestos con flúor dando lugar a una nueva forma de obtener selectividad en los fármacos antitumorales.

Basándose en estas premisas, los departamentos de Química Inorgánica y Fisiología de la Universidad de Zaragoza han desarrollado este trabajo de fin de grado, en el cual se llevan a cabo diferentes ensayos a temperatura fisiológica (37°C) y en condiciones de hipertermia (2 h a 41°C y 70 h a 37°C), para estudiar y comparar la actividad antitumoral *in vitro* de tres complejos de oro y de sus correspondientes ligandos libres, tanto en presencia como en ausencia de átomos de flúor en su estructura.

En las figuras 4 y 5 se recogen las estructuras de los diferentes complejos metálicos ensayados en el presente Trabajo fin de Grado. Dichos complejos se basan en centros de oro (I) coordinados a fosfinas derivadas de la PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano) (figura 3) por alquilación de uno de sus átomos de N por una cadena hidrocarbonada, o por una cadena polifluorada (figura 3).

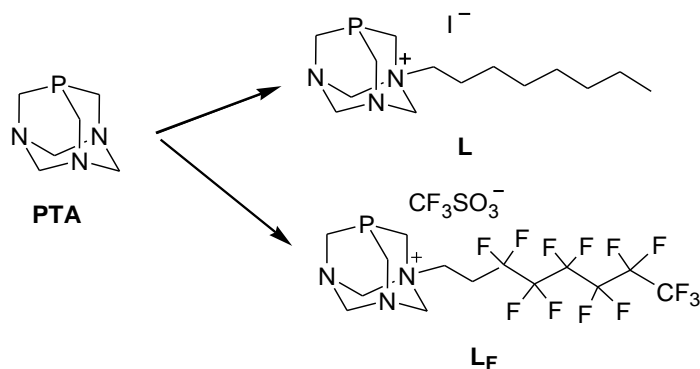


Figura 3. Representación de los ligandos del tipo fosfina empleados en la coordinación a centros metálicos de oro (I).

En el grupo de trabajo dirigido por la Dra. Elena Cerrada, se han sintetizado un elevado número de complejos de oro con la fosfina PTA y moléculas derivadas de ella que han dado lugar a compuestos activos frente a diferentes líneas celulares, entre las que se incluyen cáncer de ovario y de colon²²⁻³⁵. Dada la experiencia en este tipo de moléculas, se sintetizaron dos familias de complejos de oro (I) en las que la diferente alquilación de la molécula de PTA por unidades hidrocarbonadas o polifluoradas (con el mismo número de átomos de C a efectos de comparación) (figuras 4 y 5) podría *a priori*, conferir diferentes propiedades a los complejos, así como diferentes efectos citotóxicos.

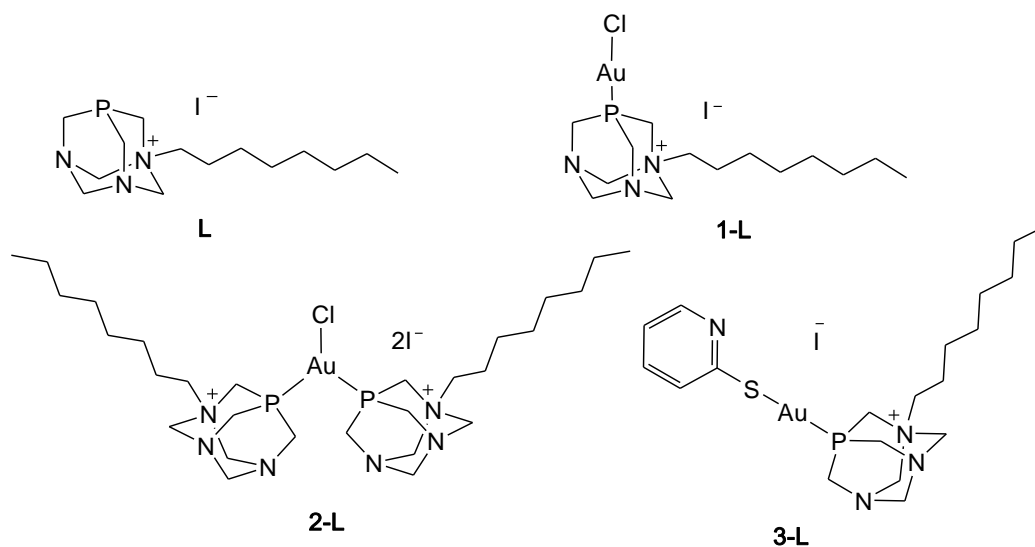


Figura 4. Complejos de oro (I) con la fosfina PTA alquilada con una cadena hidrocarbonada.

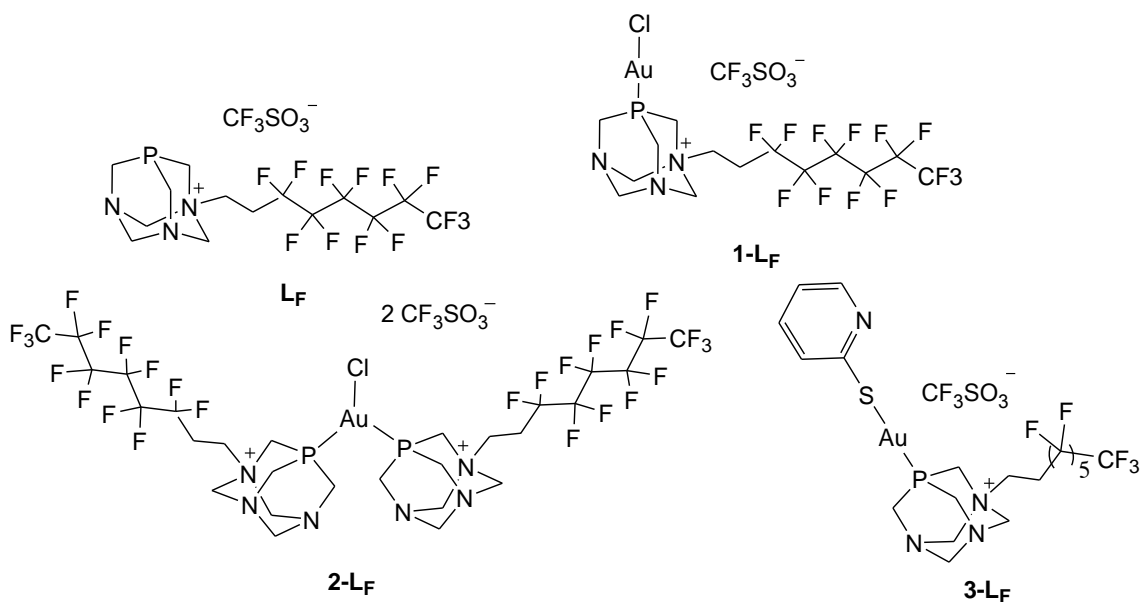


Figura 5. Complejos de oro (I) con la fosfina PTA alquilada con una cadena polifluorada.

3. OBJETIVOS

A continuación se muestran los objetivos principales de este trabajo:

- Determinación de la actividad antitumoral de los complejos de oro (I) presentados en el apartado anterior (*figuras 4 y 5*), así como de sus ligandos libres para demostrar la relevancia de su coordinación a un centro metálico.
- Aproximación a su mecanismo de acción.

- Evaluación de los efectos del flúor, mediante la comparación entre las moléculas con la fosfina alquilada con una cadena polifluorada y las que llevan la fosfina alquilada con una cadena policarbonada.

- Estudio de los efectos de la hipertermia sobre la actividad antitumoral de los complejos de oro

Para el estudio de la actividad anticancerígena se han utilizado células de cáncer de colon humano Caco-2/TC7. Esta línea celular se caracteriza porque al alcanzar el estado de confluencia, en 7 días, pasan de ser células indiferenciadas (cancerígenas) a enterocitos normales. Esta peculiaridad nos ha facilitado el desarrollo de los siguientes estudios realizados para la consecución de estos objetivos:

- Estudios farmacodinámicos realizados mediante ensayos de viabilidad celular (MTT), tanto en células indiferenciadas para definir la actividad y perfil de los complejos, como en células diferenciadas para medir los posibles efectos secundarios. Además, los ensayos MTT han sido realizados tanto en condiciones fisiológicas (72 horas a 37°C) como en condiciones de hipertermia (70 horas a 37°C y 2 horas a 41°C).

- Estudios de daño oxidativo mediante la determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno

Con todo ello se pretende lograr un acercamiento a este nuevo tipo de tratamiento frente al cáncer, mediante una primera evaluación de los nuevos complejos de oro desarrollados por el equipo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Síntesis química de los complejos de oro

Los diferentes compuestos ensayados en este trabajo (ver *figuras 4 y 5* de la introducción) han sido preparados en el grupo de la Dra. Elena Cerrada, del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza. Se trata de complejos de oro (I) coordinados a dos fosfinas diferentes derivadas de la PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano) (*figura 3*) a la que se ha alquilado con una cadena hidrocarbonada ($-(CH_2)_7CH_3$) y una cadena polifluorada ($-CH_2CH_2(CH_2)_5CF_3$).

- Síntesis de $[PTA-(CH_2)_7CH_3]I$ (**L**) y de $[PTA-CH_2CH_2(CH_2)_5CF_3]CF_3SO_3$ (**L_F**). Sobre una disolución de PTA (1 mmol) en acetona se añade 1-Iodooctano o $TfO-CH_2CH_2(CF_2)_5CF_3$ (1 mmol). En el primer caso la reacción se deja 3 días en agitación precipitando un sólido blanco que se aísla por filtración. En el caso de **L_F** la reacción se deja 35 min a 0°C y tras evaporación del disolvente se aísla un sólido blanco al adicionar dietiléter.

- Síntesis de $[AuCl(PTA-(CH_2)_7CH_3)]I$ (**1-L**) y $[AuCl(PTA-CH_2CH_2(CH_2)_5CF_3)]CF_3SO_3$ (**1-L_F**). A una disolución de $[AuCl(tht)]$ (tht = tetrahidrotiofeno) (0,5 mmol) en diclorometano se añaden las fosfinas **L** o **L_F** (0,5 mmol). Las suspensiones obtenidas se agitan durante 4-5 h a temperatura ambiente y los sólidos se aíslan por filtración.

- Síntesis de $[\text{AuCl}(\text{PTA}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3)_2]\text{I}_2$ (**2-L**) y $[\text{AuCl}(\text{PTA}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CF}_3)(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]$ (**2-L_F**). Sobre una suspensión de $[\text{AuCl}(\text{PTA}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3)]\text{I}$ (**1-L**) o de $[\text{AuCl}(\text{PTA}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CF}_3)\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (**1-L_F**) (0,15 mmol) en acetona se añade la fosfina correspondiente **L** o **L_F** (0,15 mmol). Tras 5 h de agitación los sólidos blancos se separan por filtración.

- Síntesis de $[\text{Au}(\text{C}_5\text{H}_5\text{NS})(\text{PTA}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3)]\text{I}$ (**3-L**) y $[\text{Au}(\text{C}_5\text{H}_5\text{NS})(\text{PTA}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CF}_3)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$ (**3-L_F**). Sobre una disolución bajo atmosfera inerte de 2-mercaptopiridina (0,20 mmol) en etanol, se añade, NaOEt (0,22 mmol). Tras 15 min de agitación se añade $[\text{AuCl}(\text{tth})]$ (0,20 mmol) dejando 2 h de agitación la suspensión formada. Sobre dicha suspensión, una vez decantada, se adiciona la fosfina correspondiente **L** o **L_F** (0,19 mmol) en acetona, dejando la reacción a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente se concentra la disolución y tras adición de dietil éter se aíslan sólidos blancos por filtración.

3.2. Cultivo celular

Se denomina al cultivo celular como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento controlado de células *in vitro*, permitiendo de esta forma el estudio de sus propiedades biológicas, fisiológicas o genéticas en un entorno que permita su proliferación, diferenciación y su envejecimiento. Es por tanto una herramienta básica en el campo de la biotecnología, ya que proporciona buenos modelos para el estudio de dichas células, permitiendo conocer, como en nuestro caso, su respuesta frente a la administración de un fármaco.

El trabajo se ha realizado con células Caco-2, una línea celular adherente procedente de carcinoma de colon humano. Un factor importante en esta línea celular es el hecho de que a los 7 días de haber sido sembradas alcancen la confluencia, de forma que su diferenciación a enterocitos normales ocurre espontáneamente. Su máxima actividad enzimática se alcanza a los 15 días de haber llegado a dicha confluencia. En concreto, se ha utilizado el clon TC7, el cual procede de pasajes tardíos (140-150), hecho que se refleja en su estabilidad y homogeneidad.

Toda manipulación que se realice con células eucariotas en cultivo debe llevarse a cabo en condiciones estériles. Por ello, todos los experimentos se han realizado en campana de flujo laminar vertical de clase II (Telstar AV-100), siguiendo el protocolo de trabajo existente en el laboratorio.

Las líneas celulares se han mantenido y se han dejado crecer en una estufa de CO_2 (Haeraeus BB16) a una temperatura de 37°C que contiene un 95% de O_2 y un 5% de CO_2 . Las células han crecido en un medio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina (1000 U/ml) al 1%, estreptomicina (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) al 1% y anfotericina (250 U/ml) al 1%. Para el cultivo de células tratadas con los complejos se ha utilizado el mismo medio sin el suplemento de FBS.

El mantenimiento de la línea celular se realiza por tripsinización. Para ello se lava el cultivo con PBS y se trata con una solución de la proteasa tripsina, que permite separar las células del sustrato sólido sobre el que crecen. Tras centrifugar 5 minutos a 3.900 rpm, se añade

medio nuevo al pellet obtenido y se realiza el conteo en un microscopio óptico, ayudándose para ello del colorante vital azul trypan y de la cámara Neubauer.

Una vez determinada la concentración celular se procede a la siembra de 300.000 células en una nueva caja de 25 cm². Para la siembra de las placas de 96 pocillos y de las botellas de 75 cm² necesarias para llevar a cabo los diferentes experimentos se procede del mismo modo, sembrando finalmente 4.000 células/pocillo y 500.000 células/botella.

3.3. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El MTT es un ensayo colorimétrico que permite medir la actividad celular de un determinado cultivo y determinar su estado tras ser sometido al tratamiento de interés, generalmente aplicado para ejercer un efecto citotóxico con el fin de disminuir la viabilidad celular.

El método se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, que se mide por absorbancia con un espectrofotómetro (TECAN).

Para el desarrollo de esta prueba, se siembran las células en una placa de 96 pocillos. Tras 24 horas de crecimiento, se añaden diferentes concentraciones de cada uno de los complejos en los diferentes pocillos, así como el disolvente orgánico (DMSO) que actuará como control. La incubación con los complejos se realiza a 72 h, después de las cuales se añaden 10 µl de reactivo MTT (5mg/ml) y se incuban a 37°C durante 3-4 horas. Posteriormente, se procede a la adición de DMSO para solubilizar los cristales de formazán y se lee la absorbancia de la placa a 540 nm.

Para analizar la viabilidad celular en condiciones de hipertermia, se pone la placa de 96 pocillos sobre una placa calefactora a 41°C durante 2 horas, incubando el resto del tiempo hasta completar las 72 h, a temperatura de 37°C.

3.4. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para comprobar si los complejos que se han ensayado afectan el equilibrio de los ROS se procede a determinar sus niveles mediante ensayos de fluorescencia.

Para ello, las células se siembran en una placa de 96 pocillos y se preincuban con medio sin SFB durante 24 horas. Pasado este tiempo se absorbe el medio y se lavan con PBS 2x; a continuación, se incuban con 100 µl DCFH-DA (diacetato-diclorofluoresceína) 20mM en un medio sin SFB o en PBS a 37°C durante 1 hora. Se elimina este medio y las células se lavan de nuevo con PBS 2x para posteriormente añadir 100 µl de medio sin SFB o PBS, añadiendo entonces los complejos de oro. Se realiza una primera medida de fluorescencia a tiempo 0 y se deja incubar 20 minutos a 37°C. Finalmente, se realizan medidas de fluorescencia cada 20 minutos monitorizando la formación del reactivo fluorescente DCF-DA (excitación a 485 nm, emisión a 535 nm).

La producción de ROS se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia, expresadas como porcentaje respecto al control (y restando a cada muestra su fluorescencia a tiempo 0).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Capacidad antitumoral de los complejos de oro

Para evaluar la eficacia del fármaco, se ha determinado el valor del IC_{50} de cada uno de los compuestos a temperatura fisiológica (*Tabla 1*). Este valor representa la concentración de complejo que es necesario añadir a un cultivo para reducir al 50% la población celular, obteniendo por tanto una medida que nos permite analizar el efecto sobre la viabilidad celular de los ocho complejos.

En primer lugar, se realizaron ensayos a 37°C con el fin de obtener resultados de los diferentes compuestos en situación control, es decir, en ausencia de hipertermia. Todos los ensayos se han hecho sobre células de carcinoma de colon humano Caco-2 indiferenciadas.

Tabla 1. Valores de IC_{50} de los ocho derivados a 37°C, obtenidos mediante MTT, en un tiempo de incubación de 72 horas.

| | L | 1-L | 2-L | 3-L |
|---|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| IC_{50} (μM) | 24,88 \pm – | 8,99 \pm 4,25 | 2,17 \pm 1,00 | 1,07 \pm 0,35 |
| | L_F | 1-L_F | 2-L_F | 3-L_F |
| IC_{50} (μM) | 6,42 \pm 1,42 | 2,61 \pm – | 1,55 \pm 0,01 | 0,50 \pm 0,05 |

De los resultados de esta tabla podemos sacar las siguientes conclusiones:

- Los complejos metálicos **1-L_F**, **2-L**, **2-L_F**, **3-L** y **3-L_F** han demostrado tener una actividad antitumoral mayor de lo esperado. Para trazar la recta y obtener el IC_{50} , se comenzó realizando el ensayo a concentraciones 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 μ M. Rápidamente pudimos observar su eficacia y la necesidad de trazar rectas de concentraciones más bajas, habiendo sido en el complejo **3-L** y **3-L_F** necesario bajar incluso un orden de magnitud (la recta se trazó tomando valores entre 0,25 y 1,25 μ M).

- El complejo **1-L**, que consiste en el átomo de oro unido a la fosfina con la cadena hidrocarbonada y a un átomo de cloro, ha disminuido considerablemente el IC_{50} respecto a la fosfina libre (**L**). Sin embargo, comparándolo con el resto de complejos es el que ha dado el valor más elevado de IC_{50} , demostrando así un peor efecto citotóxico que el resto.

- De forma general se observa que las fosfinas libres **L** y **L_F**, presentan valores de IC_{50} más altos que cuando se coordinan al centro metálico de oro. Este hecho indica que dicha coordinación favorece la citotoxicidad de los complejos resultantes en las condiciones del ensayo. Sin embargo, es de destacar que la fosfina fluorada **L_F** tiene un valor mucho más bajo que la fosfina hidrocarbonada **L**. De igual forma se observa esta misma tendencia en los complejos de oro con dicha fosfina, que al ser comparados con los complejos de la fosfina hidrocarbonada (**L**) presentan valores de IC_{50} más bajos.

Al observar que el efecto antitumoral se obtiene con concentraciones tan bajas de fármaco, se podría proponer en un inicio su uso como agente quimioterápico, ya que al no utilizar altas concentraciones, el efecto sobre el resto del organismo podría ser menor. A pesar de ello, esta no es, ni mucho menos, la única característica que tiene relevancia a la hora de diseñar un agente anticancerígeno.

Es por este motivo que se ha estudiado la citotoxicidad de los compuestos sobre células normales (*Tabla 2*), de forma que podamos confirmar la ausencia de efectos secundarios graves sobre el resto del organismo, ya que el hecho de que la concentración necesaria de fármaco sea baja, dada su eficacia, no puede asegurar una total seguridad. Para que un fármaco sea un buen anticancerígeno debe ser selectivo, es decir, debe actuar específicamente sobre las células tumorales y, a su vez, no inhibir el crecimiento de las células normales.

Para realizar este estudio, se ha aplicado el tratamiento a un cultivo de células Caco-2 diferenciadas, que son los enterocitos normales.

Tabla 2. Porcentaje de células viables con respecto al control (100%). Las células han sido sometidas durante 72 horas al tratamiento con cada complejo a las concentraciones correspondientes del IC₅₀.

| | L | 1-L | 2-L | 3-L |
|---------------------|----------------------|------------------------|----------------|------------------------|
| % Viabilidad | 116,88 ± 3,92 | 127,65 ± 14,53 | 133,80 ± 12,21 | 104,14 ± 13,80 |
| | L_F | 2-L_F | 3-L | 4-L_F |
| % Viabilidad | 116,15 ± 10,70 | 134,66 ± 16,17 | 138,66 ± 19,17 | 109,36 ± 19,19 |

Podemos observar que los compuestos no reducen la viabilidad de las células normales, incluso la aumentan ligeramente. Esto es muy positivo a la hora de considerar los complejos como anticancerígenos, ya que significa que son específicos frente a las células cancerosas.

Para entender el motivo de esta diferencia entre el efecto sobre células cancerosas y normales, se ha procedido a analizar el comportamiento de la diana molecular más común de los complejos de oro: la tiorredoxina reductasa. Para ver si esta enzima es funcional o deja de serlo en presencia de los complejos, se ha procedido a estudiar el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

4.2. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)

En la mayor parte de los tipos de cáncer se han detectado niveles elevados de ROS, por lo que se considera que son responsables de promover ciertos aspectos relacionados con el desarrollo del tumor y su progresión. También se observan niveles elevados de las proteínas antioxidantes, lo que sugiere que el nivel de ROS adecuado para la supervivencia de la célula cancerosa es muy delicado. Debido a esta situación, muchos de los actuales agentes anticancerígenos buscan romper este equilibrio para inducir la muerte de la célula³⁶⁻³⁷.

Como se ha comentado en la introducción, en el caso de los complejos de oro uno de los posibles mecanismos para romper este equilibrio es la inhibición de la tiorredoxina

reductasa. Como el mecanismo de acción de nuestros complejos es desconocido hasta ahora, hemos estudiado los niveles de ROS para evaluar esta enzima como posible diana terapéutica. Los siguientes datos (*Figuras 6, 7, 8, 9 y 10*) se han obtenido mediante ensayos de fluorescencia, tal y como se ha descrito en la sección experimental.

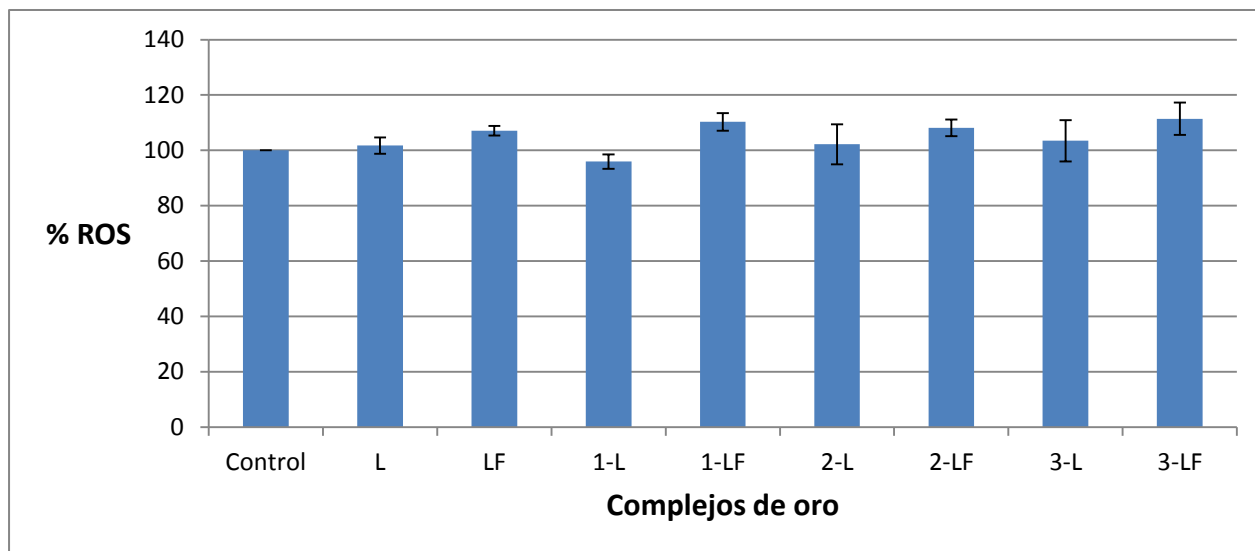
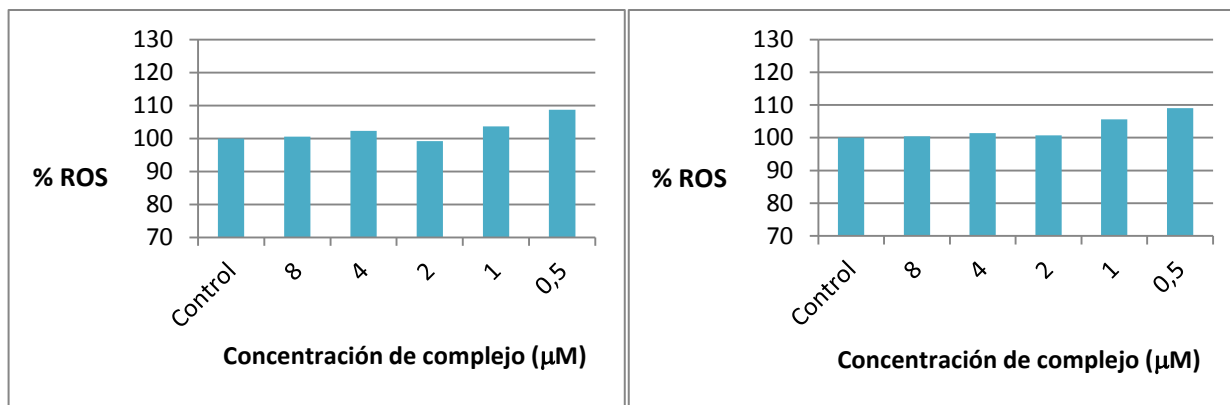


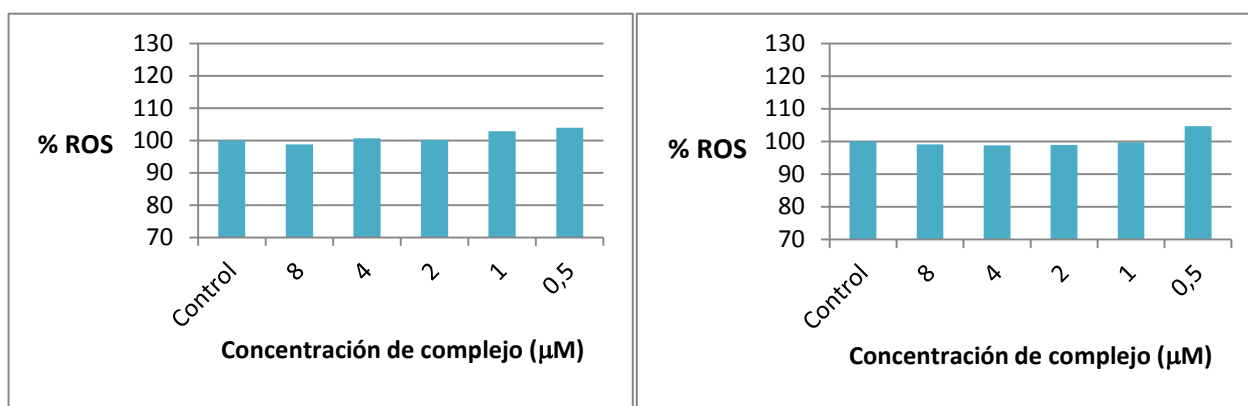
Figura 6. Porcentaje de fluorescencia con respecto al control obtenido en células tumorales incubadas 3 horas con cada uno de los complejos en la concentración del IC_{50} . El control consiste en aplicar a las células Caco-2 el disolvente en el cual están diluidos los complejos metálicos (DMSO).

Podemos observar que el nivel de especies reactivas de oxígeno apenas varía entre los diferentes complejos y el control. Esto significa que el equilibrio redox de las células cancerosas no se ve afectado por la presencia de los complejos, por lo que podemos descartar la tiorredoxina reductasa como diana molecular. Si así fuera, el nivel de ROS se vería aumentado debido a la inhibición de la enzima. En el caso del complejo **1-L**, el nivel disminuye incluso por debajo del nivel del control, lo cual contradice con más fuerza la hipótesis inicial.

A pesar de los resultados anteriores, por sí solos no son datos concluyentes para descartar la actuación de los complejos de oro frente al equilibrio de las especies reactivas, ya que cada complejo ha sido ensayado solamente en un tiempo (3 horas) y en una concentración (IC_{50}). Para profundizar en el estudio, se han seleccionado los dos compuestos más potentes (**3-L** y **3-LF**) y se ha analizado el nivel de fluorescencia en distintos tiempos y en un rango más amplio de concentraciones (*Figuras 7, 8, 9 y 10*).



Figuras 7 y 8. Porcentaje de ROS frente a la concentración de complejos **3-L** y **3-L_F**, respectivamente. El tiempo de incubación en este caso es de 1 hora.



Figuras 9 y 10. Porcentaje de ROS frente a la concentración de complejos **3-L** y **3-L_F**, respectivamente. El tiempo de incubación en este caso es de 3 horas.

A la vista de estos resultados, se puede afirmar que el nivel de especies reactivas de oxígeno permanece invariable frente al aumento de concentración y de tiempo. Se observa un pequeño aumento en las concentraciones mínimas (0,5 μM), que en el caso del complejo **3-L_F** coincide con el IC_{50} , aunque el equilibrio de ROS se estabiliza (con un nivel muy similar al control) al aumentar la concentración por encima de 1 μM , tanto en los ensayos a 1 hora como en los ensayos a 3 horas.

Por tanto, en líneas generales podemos concluir que el nivel de ROS de las células cancerosas apenas se ve alterado por la presencia de los complejos de oro, de forma que queda descartada la tiorredoxina reductasa como diana molecular de dichos fármacos.

4.3. Efectos de la hipertermia

A continuación se realizaron ensayos MTT en condiciones de hipertermia para analizar los efectos del aumento de temperatura sobre la citotoxicidad de los compuestos (*Tabla 3*). Para ello, se han incubado los complejos con las células durante 70 horas a temperatura fisiológica (37°C) y durante 2 horas a 41°C. Así, hemos obtenido los valores IC_{50} de cada uno de los

complejos en estas nuevas condiciones. Los ensayos se han realizado sobre células de carcinoma de colon humano Caco-2 indiferenciadas.

Tabla 3. Valores de IC_{50} de los ocho derivados en condiciones de hipertermia, obtenidos mediante MTT, en un tiempo de incubación de 72 horas en total.

| | L | 1-L | 2-L | 3-L |
|--|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| IC_{50} (μM) | 95,68 \pm 9,60 | 22,99 \pm 13,26 | 32,64 \pm – | 2,47 \pm 0,21 |
| | L_F | 1-L_F | 2-L_F | 3-L_F |
| IC_{50} (μM) | 15,36 \pm 3,95 | 21,76 \pm – | 17,40 \pm 2,97 | 1,72 \pm 0,07 |

Se puede observar que estos valores IC_{50} son muy diferentes a los de los complejos metálicos ensayados en condiciones fisiológicas. Excepto en el caso de los complejos **3-L** y **3-L_F**, los valores han aumentado en gran medida. Esto contradice los resultados que se esperaban del experimento, ya que *a priori*, la idea de emplear condiciones de hipertermia era precisamente la de aumentar la capacidad antitumoral de los compuestos, gracias a una mayor solubilización de los mismos y en consecuencia favorecer su entrada en la célula. Sin embargo, el hecho de que el aumento de temperatura no genere dicha disminución no es suficiente por sí solo para explicar unos valores tan desviados de los de partida.

El hecho de que en algunas de las medidas las desviaciones sean muy elevadas, nos está indicando que el experimento podría estar acompañado de algún error en su diseño al tratarse de la primera vez que realizábamos estos ensayos de hipertermia en nuestro laboratorio. Sin embargo, no descartamos que pudiera tratarse de un mecanismo de defensa de las células frente a situaciones adversas, como podría ser la autofagia. Ensayos en este sentido tenemos proyectado hacer, en concreto inhibiendo la autofagia con cloroquina.

5. CONCLUSIONES

1. Los complejos metálicos **1-L_F**, **2-L**, **2-L_F**, **3-L** y **3-L_F** han demostrado tener una alta actividad antitumoral frente a células de cáncer de colon humano. A través de los ensayos MTT se han obtenido los valores IC_{50} , situados entre 0,5 y 3 μM , siendo el complejo **3-L_F** el más eficaz de los cinco.
2. Aunque el complejo **1-L** ha disminuido considerablemente el valor de IC_{50} respecto a la fosfina libre (**L**), resulta ser el complejo menos citotóxico de ambas familias al presentar el valor más elevado (8,99 μM).
3. Los seis complejos de oro son inocuos para los enterocitos normales (células Caco-2/TC7 diferenciadas), lo que significa que tienen selectividad frente a las células cancerosas y por tanto no presentan efectos secundarios.
4. Las fosfinas libres **L** y **L_F** presentan valores de IC_{50} más altos que cuando se coordinan al centro metálico de oro. Este hecho indica que dicha coordinación favorece la citotoxicidad de los complejos resultantes en las condiciones del ensayo.

5. La fosfina fluorada **L_F** tiene un valor mucho menor que la fosfina hidrocarbonada **L** (6,42 μ M frente a 24,88 μ M, respectivamente). Esta tendencia se repite en los complejos de oro con dicha fosfina, que al ser comparados con los complejos de la fosfina hidrocarbonada (**L**) presentan valores de IC₅₀ más bajos. Esto demuestra el efecto potenciador que tienen los átomos de flúor sobre la toxicidad de los complejos de oro.

6. Las condiciones en las que se ha aplicado la hipertermia sobre el cultivo celular no parecen mostrar resultados concluyentes, por lo que es necesario seguir en este camino bien cambiando las condiciones de ensayo o bien descartando vías celulares que podrían estar implicadas en esta agresión térmica.

7. Los complejos metálicos estudiados no generan un aumento de las especies reactivas de oxígeno en ninguna de las condiciones establecidas. Esto nos permite descartar la tiorredoxina reductasa como diana terapéutica. Este hecho nos plantea nuevas líneas de actuación.

5. CONCLUSIONS

1. Metal complexes **1-L_F**, **2-L**, **2-L_F**, **3-L** y **3-L_F** have shown high antitumor activity on colon cancer cells. IC₅₀ values have been obtained from MTT assays, being in a range between 0,5 and 3 μ M, where **3-L_F** is the most effective complex of the group.

2. Although **1-L** complex has a lower IC₅₀ value than free phosphine (**L**), is the least cytotoxic complex of the two families, having the highest value (8,99 μ M).

3. The six gold complexes are innocuous on normal enterocytes (Caco-2 /TC7 cells that have reached confluence), which means they have selectivity against cancer cells and therefore they have no side effects.

4. Free phosphines **L** and **L_F** have higher IC₅₀ values than phosphines coordinated to the gold metal center. This fact means that this coordination increases cytotoxicity in phosphine-coordinated complexes for assay conditions.

5. Fluorinated phosphine (**L_F**) IC₅₀ value is much lower than hydrocarbon phosphine (**L**) value (6,42 and 24,88 μ M, respectively). In fluorinated phosphine-coordinated complexes, this tendency appears too, because these complexes have lower IC₅₀ values than hydrocarbon phosphine-coordinated ones. This fact shows the enhancer effect of fluorine atoms on the toxicity of gold complexes.

6. Hyperthermia assay conditions applied to the cell culture do not show conclusive results. We propose two alternatives to continue the work in this line: either to change assay conditions or to discard cellular pathways probably implicated in this thermal aggression.

7. These gold complexes do not generate an increase of the reactive oxygen species levels in any assay condition, so thiorredoxin reductase seems not to be the therapeutic target. This fact offers us new lines of action.

6. REFERENCIAS

1. Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev.* 1999;99(9):2451–66.
2. Amin A, Buratovich M. New Platinum and Ruthenium Complexes - the Latest Class of Potential Chemotherapeutic Drugs - a Review of Recent Developments in the Field. *Mini-Reviews Med Chem [Internet]*. 2009;9(13):1489–503.
3. Reedijk J. Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes: Significance for effectiveness as anticancer drugs. *Platin Met Rev.* 2008;52(1):2–11.
4. Higby DJ, Higby DJ, Wallace HJ, Albert DJ, Holland JF. Diaminodichloroplatinum: A phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer.* 1974;33(5):1219–25.
5. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573–84.
6. Weiss RB, Christian MC. New Cisplatin Analogues in Development: A Review. *Drugs.* 1993;46(3):360–77.
7. Reedijk J. Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem Commun.* 1996;(7):801–6.
8. Flores-Aguilar et al (2007) Resumen. Development and Current Status of. *J Shellfish Res.* 2007;26(3):282007.
9. Rilak A, Bugar D. European Journal of Medicinal Chemistry Platinum , palladium , gold and ruthenium complexes as anticancer agents : Current clinical uses , cytotoxicity studies and future perspectives Tatjana Lazarevi. 2017;142:8–31.
10. Wang HH, Su CH, Wu YJ, Lin CAJ, Lee CH, Shen JL, et al. Application of gold in biomedicine: Past, present and future. *Int J Gerontol [Internet]*. 2012;6(1):1–4.
11. Ott I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. 2009;253:1670–81.
12. Casini A, Hartinger C, Gabbiani C, Mini E, Dyson PJ, Keppler BK, et al. Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J Inorg Biochem.* 2008;102(3):564–75.
13. Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Mu S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. 2000;6125:6118–25.
14. Zhang J, Li X, Han X, Liu R, Fang J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci [Internet]*. 2017;38(9):794–808.
15. Ciechanover A. EMBO MEMBER ' S REVIEW The ubiquitin – proteasome pathway : on protein death and cell life. 1998;17(24):7151–60.
16. Milacic V, Chen D, Ronconi L, Landis-piowar KR, Fregona D, Dou QP. A Novel Anticancer Gold (III) Dithiocarbamate Compound Inhibits the Activity of a Purified

20S Proteasome and 26S Proteasome in Human Breast Cancer Cell Cultures and Xenografts. 2006;(iii):10478–87.

17. Gabano E, Colangelo D, Rita A, Osella D. The influence of temperature on antiproliferative effects , cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt (II) -drugs. 2008;102:629–35.
18. Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. Eur J Cancer [Internet]. 2008;44(17):2546–54.
19. Renfrew AK, Scopelliti R, Dyson PJ, F EP. Use of Perfluorinated Phosphines to Provide Thermomorphic Anticancer Complexes for Heat-Based Tumor Targeting. 2010;(11):2239–46.
20. Filler R, Saha R, Sciences P. Fluorine in medicinal chemistry : a century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights. 2009;777–91.
21. Clavel CM, Nowak-sliwinska P, Emilia P, Dyson PJ. Chemical Science In vivo evaluation of small-molecule thermoresponsive anticancer drugs potentiated by hyperthermia. 2015;2795–801.
22. S. Miranda, E. Vergara, F. Mohr, D. de Vos, E. Cerrada, A. Mendia and M. Laguna, Synthesis, characterization, and in vitro cytotoxicity of some gold(I) and trans platinum(II) thionate complexes containing water-soluble PTA and DAPTA ligands. X-ray crystal structures of Au(SC4H3N2)(PTA) , trans- Pt(SC4H3N2)(2)(PTA)(2) , trans- Pt(SC5H4N)(2)(PTA)(2) , and trans- Pt(SC5H4N)(2)(DAPTA)(2), Inorg. Chem., 2008, 47, 5641-5648.
23. E. Vergara, A. Casini, F. Sorrentino, O. Zava, E. Cerrada, M. P. Rigobello, A. Bindoli, M. Laguna and P. J. Dyson, Anticancer Therapeutics That Target Selenoenzymes: Synthesis, Characterization, in vitro Cytotoxicity, and Thioredoxin Reductase Inhibition of a Series of Gold(I) Complexes Containing Hydrophilic Phosphine Ligands, ChemMedChem, 2010, 5, 96-102.
24. E. Vergara, E. Cerrada, C. Clavel, A. Casini and M. Laguna, Thiolato gold(I) complexes containing water-soluble phosphane ligands: a characterization of their chemical and biological properties, Dalton Trans., 2011, 40, 10927-10935.
25. E. Vergara, E. Cerrada, A. Casini, O. Zava, M. Laguna and P. J. Dyson, Antiproliferative Activity of Gold(I) Alkyne Complexes Containing Water-Soluble Phosphane Ligands, Organometallics, 2010, 29, 2596-2603.
26. E. Garcia-Moreno, A. Tomas, E. Atrian-Blasco, S. Gascon, E. Romanos, M. J. Rodriguez-Yoldi, E. Cerrada and M. Laguna, In vitro and in vivo evaluation of organometallic gold(I) derivatives as anticancer agents, Dalton Trans., 2016, 45, 2462-2475.
27. E. Atrián-Blasco, S. Gascón, M. J. Rodríguez-Yoldi, M. Laguna and E. Cerrada, Synthesis of Gold(I) Derivatives Bearing Alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane as Selective Anticancer Metallodrugs, Eur. J. Inorg. Chem., 2016, 2791-2803.
28. E. García-Moreno, S. Gascón, J. A. G. d. Jalón, E. Romanos, M. J. Rodriguez-Yoldi, E. Cerrada and M. Laguna, In vivo anticancer activity, toxicology and histopathological studies of the thiolate gold(I) complex [Au(Spyrimidine)(PTA-CH2Ph)]Br, Anti-Cancer

Agents Med. Chem., 2015, 15, 773-782.

29. E. Garcia-Moreno, S. Gascon, E. Atrian-Blasco, M. J. Rodriguez-Yoldi, E. Cerrada and M. Laguna, Gold(I) complexes with alkylated PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) phosphanes as anticancer metallodrugs, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 79, 164-172.
30. E. Guerrero, S. Miranda, S. Luttenberg, N. Frohlich, J. M. Koenen, F. Mohr, E. Cerrada, M. Laguna and A. Mendia, trans-Thionate Derivatives of Pt(II) and Pd(II) with Water-Soluble Phosphane PTA and DAPTA Ligands: Antiproliferative Activity against Human Ovarian Cancer Cell Lines, *Inorg. Chem.*, 2013, 52, 6635-6647.
31. E. Garcia-Moreno, S. Gascon, M. J. Rodriguez-Yoldi, E. Cerrada and M. Laguna, S-Propargylthiopyridine Phosphane Derivatives As Anticancer Agents: Characterization and Antitumor Activity, *Organometallics*, 2013, 32, 3710-3720.
32. E. García-Moreno, E. Cerrada, M. J. Bolsa, A. Luquin and M. Laguna, Water-Soluble Phosphanes Derived from 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane and Their Reactivity towards Gold(I) Complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2013, 2020-2030.
33. E. Atrian-Blasco, S. Gascon, M. J. Rodriguez-Yoldi, M. Laguna and E. Cerrada, Novel Gold(I) Thiolate Derivatives Synergistic with 5-Fluorouracil as Potential Selective Anticancer Agents in Colon Cancer, *Inorg. Chem.*, 2017, 56, 8562-8579.
34. C. Sanchez-de-Diego, I. Marmol, R. Perez, S. Gascon, M. J. Rodriguez-Yoldi and E. Cerrada, The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, 166, 108-121.
35. I. Marmol, M. Virumbrales-Munoz, J. Quero, C. Sanchez-De-Diego, L. Fernandez, I. Ochoa, E. Cerrada and M. J. R. Yoldi, Alkynyl gold(I) complex triggers necroptosis via ROS generation in colorectal carcinoma cells, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, 176, 123-133.
36. Watson, J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biology* 2013, 3.
37. Romero-Canelon, I.; Sadler, P.J. Next generation metal anticancer complexes: multi-targeting via redox modulation. *Inorganic Chemistry* 2013, 52, 12276-12291.